

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mitra Anggrek Indonesia (MAI), jalan Hasanuddin, Junrejo, Batu. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli 2018 sampai bulan September 2018.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian yaitu Laminar Air Flow, Timbangan Digital, glassware, Autoclave, Cawan Petri, Erlenmeyer, Gelas ukur, Pinset, scalpel and blade, gunting, botol kultur, kertas Ph indikator, Rak kultur.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu media dasar *Musashige & skoog*, eksplan dasar benih Mentigi (*Vaccinium vringiaefolium* (Bl.) Miq) zat pengatur tumbuh IBA dan TDZ.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu RAL dengan menggunakan dua faktor perlakuan:

- a. Pertama menggunakan konsentrasi (X) dengan dengan tiga

taraf konsentrasi. Yaitu:

X1 : IBA 1 ppm

X2 : IBA 2 ppm

X3 : IBA 3 ppm

- b. Faktor kedua menggunakan konsentrasi Faktor menggunakan konsentrasi

Thidiazuron (Y) dengan tiga taraf konsentrasi yaitu:

Y1 : TDZ 0,025 ppm

Y2 : TDZ 0,050 ppm

Y3 : TDZ 0,075 ppm

Sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan dalam satu perlakuan terdapat 5 botol 2 eksplan dan setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 ulangan. Kombinasi perlakuan disajikan pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Kombinasi perlakuan

IBA (ppm)	TDZ (ppm)		
	Y1	Y2	Y3
X1	X1Y1	X1Y2	X1Y3
X2	X2Y1	X2Y2	X2Y3
X3	X3Y1	X3Y2	X3Y3

Keterangan tabel :

X1Y1 : IBA 1 ppm + TDZ 0,025 ppm

X1Y2 : IBA 1 ppm + TDZ 0,050 ppm

X1Y3 : IBA 1 ppm + TDZ 0,075 ppm

X2Y1 : IBA 2 ppm + TDZ 0,025 ppm

X2Y2 : IBA 2 ppm + TDZ 0,050 ppm

X2Y3 : IBA 2 ppm + TDZ 0,075 ppm

X3Y1 : IBA 3 ppm + TDZ 0,025 ppm

X3Y2 : IBA 3 ppm + TDZ 0,050 ppm

X3Y3 : IBA 3 ppm + TDZ 0,075 ppm

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Menyiapkan botol kultur dan alat yang akan digunakan yakni petridish, scalpel dan pinset. Mencuci bersih botol dan alat-alat dengan menggunakan sabun cuci, kemudian dikeringkan. Setelah kering alat berupa petridish, scalpel dan pinset dibungkus menggunakan kertas polos dan plastik, kemudian diikat menggunakan karet pentil. Sterilisasi yang digunakan yaitu menggunakan uap dan tekanan. Selanjutnya menyiapkan kompor, tabung gas dan autoclave. Kemudian mengisi air kedalam autoclave sampai batas yang telah ditentukan. Memasang sekat yang ada di autoclave, untuk meletakkan alat-alat kultur yang akan disterilisasi. Selanjutnya menutup rapat autoclave. Setelah itu memanaskan autoclave sampai suhu tekanan 10 psi selama 20 menit. Setelah itu kompor dimatikan. Menunggu sampai autoclave benar-benar dingin sebelum membuka tutup autoclave, apabila langsung dibuka saat masih panas akan menyebabkan boto kultur atau alat-alat kultur berbahan kaca yang telah disterilisasi pecah dikarenakan tekanan yang dalam autoclave masih tinggi. Mengeluarkan alat-alat kemudian meletakkan diruang yang steril. Selanjutnya lat bisa digunakan.

3.4.2 Pembuatan Media Murashige & Skoog (MS)

Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Menimbang masing-masing bahan komposisi media MS dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang akan digunakan. Kemudian semua bahan dimasukkan kedalam gelas ukur kecuali bahan agar. Kemudian menambahkan air sampai 1 liter. Selanjutnya mengukur pH pada kondisi 5,8 dengan menambahkan NaOH untuk menaikkan pH dan HCl untuk menurunkan pH. Memasak larutan dengan suhu konstan kemudian memasukkan

agar perlahan-lahan agar tidak menggumpal, Kemudian diaduk sampai tidak ada gumpalan dan mendidih. Kemudian dimasukkan kedalam kultur disesuaikan dengan jumlah botol yang telah disiapkan. Botol ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet pentil sekencang-kencangnya. Diberi label pada masing-masing media. Setelah itu memasukkan media kedalam autoclave untuk sterilisasi dalam tekanan 10 psi selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi selanjutnya diletakkan pada rak-rak kultur. Media disimpan selama 3-4 hari untuk mengetahui apakah media kontam atau tidak.

3.4.3 Sterilisasi, Isolasi dan Penanaman Eksplan

Bahan tanam yang digunakan yaitu biji tanaman *Mentigi*. Sterilisasi dilakukan dengan 2 perlakuan. Perlakuan pertama yaitu diluar LAF dan langkah kedua yaitu di dalam LAF. Eksplan dimasukkan dalam botol kaca (botol selai) steril. Mencuci eksplan di air mengalir + deterjen selama 15 menit. Kemudian merendamnya dengan fungisida dengan konsentrasi 4 gr/100L 30 menit lalu dibilas dengan aquades steril sampai sisa fungisida hilang, selanjutnya merendam dengan bakterisida dengan konsentrasi 4 gr/100L selama 30 menit lalu dibilas dengan aquades steril sampai sisa bakterisida hilang. Perlakuan kedua yang dilakukan didalam LAF. Eksplan direndam didalam alkohol 70% selama 5 menit sambil digoyang, selanjutnya dibilas dengan aquades steril sebanyak 5 kali. Setelah semua sterilisasi selesai siap dipindahkan ke media padat yang telah di sterilisasi. penanaman pada media perlakuan dengan mengambil eksplan berupa kotiledon untuk benih. Kemudian botol ditutup rapat dengan plastik PP dan diletakkan pada rak kultur.

3.4.4 Variabel pengamatan

a. Persentase benih pecah

$$\frac{\sum \text{eksplan hidup setiap perlakuan}}{\sum \text{seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

b. Persentaseeksplan bertunas

Persentase eksplan bertunas yang terbentuk diamati 3 hari sekali selama 45 hari setelah tanam (HST).

$$\frac{\sum \text{eksplan yang bertunas}}{\sum \text{seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

c. Persentase eksplan kontaminasi

$$\frac{\sum \text{kontaminasi eksplan}}{\sum \text{seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

d. Persentase eksplan mati

Eksplan yang sudah menunjukkan pertumbuhan namun pada pengamatan selanjutnya mati.

$$\frac{\sum \text{eksplan yang mati}}{\sum \text{eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

e. Persentase eksplan berkalus

$$\frac{\sum \text{eksplan yang berkalus}}{\sum \text{eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

f. Analisis data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Serta dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA), apabila berpengaruh nyata akan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf kesalahan 5%.